

= DE 44 33 307A



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 6 :</b> <b>C12N 15/54, 15/82, 5/10, A01H 5/00,</b> <b>C11B 1/00, C12Q 1/68</b>		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/09394</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 28. März 1996 (28.03.96)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE95/01278  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 15. September 1995 (15.09.95)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 44 33 307.2 19. September 1994 (19.09.94) DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> NORD-DEUTSCHE PFLANZENZUCHT HANS-GEORG LEMBKE KG [DE/DE]; Hohenlicht, D-24363 Holtsee (DE). DEUTSCHE SAATVEREDELUNG LIPPSTADT-BREMEN GMBH [DE/DE]; Weißenburger Strasse 5, D-59524 Lippstadt (DE). KWS KLEINWANZLEBENER SAATZUCHT AG [DE/DE]; Grimsehlstrasse 31, D-37555 Einbeck (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> FRENTZEN, Margit [DE/DE]; Ohnhorstrasse 18, D-22609 Hamburg (DE). HANKE, Christiane [DE/DE]; Mühlenweg 30, D-22880 Wedel (DE). PETEREK, Gabriele [DE/DE]; Ruthsweg 11, D-22307 Hamburg (DE). WOLTER, Peter [DE/DE]; Ohnhorstrasse 18, D-22609 Hamburg (DE).		<b>(74) Anwalt:</b> BAUER, Wulf; Bayenthalgürtel 15, D-50968 Köln (DE).  <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, CN, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(54) Title:</b> NUCLEIC ACID FRAGMENT AND PRODUCTS DERIVED THEREFROM  <b>(54) Bezeichnung:</b> NUKLEINSÄUREFRAGMENT UND DARAUS ABGELEITETE PRODUKTE  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to DNA sequences which code vegetable acyl transferases and the use of these sequences to change the fatty acid spectrum of lipids.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für pflanzliche Acyltransferasen kodieren, sowie die Verwendung dieser Sequenzen zur Veränderung des Fettsäurespektrums von Lipiden.</p>			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

### Nukleinsäurefragment und daraus abgeleitete Produkte

Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für pflanzliche Acyltransferasen kodieren, sowie die Verwendung dieser Sequenzen zur Veränderung des Fettsäurespektrums von Lipiden.

Öle und Fette (Triacylglycerine) finden im Nahrungsmittelbereich und im oleo-chemisch-technischen Bereich vielfältige Verwendung, wobei allerdings unterschiedliche Anforderungen an ihre Qualität, d. h. an ihre Fettsäurespektren gestellt werden. Im Chemiebereich sind Triacylglycerine mit möglichst homogenen Fettsäurespektren erwünscht, d. h. alle drei Glycerinpositionen sollen möglichst mit derselben Fettsäure verestert sein. Je nach Verwendungszweck sind ganz unterschiedliche Fettsäuren, wie z. B. Laurin-, Öl-, Ricinol- oder Erucasäure, interessant.

Bei dem Einsatz derartig reiner Rohstoffe fallen weniger Nebenprodukte an, so daß sich der Aufwand für Reinigung und Verarbeitung erheblich verringert und somit die Kosten/Nutzenrelation verbessert. Sobald Öle mit hoher, gleichbleibender Qualität und in ausreichenden Mengen verfügbar sein werden, können sich neue Absatzmärkte und Anwendungsmöglichkeiten eröffnen, die derzeit aus ökonomischer Sicht noch nicht tragfähig sind.

Um die Qualität pflanzlicher Öle den Erfordernissen der chemischen Industrie anzupassen, bieten sich generell folgende Wege an: zum einen die Entwicklung leistungsstarker Kulturpflanzen aus Wildpflanzen, deren Samenöle homogene Fettsäurespektren aufweisen, wie z. B. bestimmte Cuphea- oder Tropaeolum-Arten, zum anderen die Vereinheitlichung der Fettsäurespektren der Öle bereits vorhandener Kulturpflanzen, wie z. B. Raps, Sonnenblume oder Sojabohne durch klassische Züchtung bzw. gezielt durch gentechnologische Eingriffe. Da die Domestizierung der Wildpflanzen sehr zeitaufwendig ist und in der Regel die Veränderung einer Vielzahl unterschiedlichster Merkmale erfordert, konzentrieren sich die Bemühungen weltweit auf die Modifizierung der bereits vorhandenen Kulturpflanzen. Es

- 2 -

ist bekannt, daß durch den Transfer eines Gens in Sense- bzw. Antisense-orientierung deutliche Veränderungen im Fettsäurespektrum des Rapsöls erzielt werden können. Darüberhinaus ist es durch klassische Züchtung bzw. durch gentechnologische Verfahren gelungen, das Fettsäurespektrum verschiedener Samenöle hinsichtlich der Ölsäure zu vereinheitlichen.

Die Vereinheitlichung des Fettsäurespektrums hinsichtlich anderer industriell interessanter Fettsäuren, die eine Kettenlänge von mehr oder deutlich weniger als 18 Kohlenstoffatomen aufweisen und die im folgenden als ungewöhnliche Fettsäuren bezeichnet werden, wie z.B. Erucasäure (cis-13-Docosensäure, 22:1) oder Laurinsäure (Dodecansäure 12:0), wurde bisher allerdings noch nicht erzielt. Aus Fettsäureanalysedaten der Öle und enzymatischen Untersuchungen zur Ölsynthese geht hervor, daß der Gehalt solcher Fettsäuren im Öl nicht allein durch die Enzymaktivitäten limitiert wird, die an der Synthese dieser Fettsäuren beteiligt sind, sondern auch durch die, die den Fettsäureeinbau in das Öl katalysieren. Vor allem die 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase, die den Fettsäureeinbau in die mittlere Glycerinposition des Öls katalysiert, ist hierbei kritisch. Dieses Enzym besitzt nämlich in den reifenden Samen bzw. Früchten von Kulturpflanzen, wie z. B. Raps, Soja oder Mais, eine sehr ausgeprägte Spezifität und Selektivität für ungesättigte C<sub>18</sub>-Fettsäuren. Es ist aber mit ungewöhnlichen Fettsäuren nicht aktiv, vor allem, wenn die sn-1-Position bereits mit einer solchen Fettsäure verestert ist. Die Eigenschaften der 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase stellen somit die entscheidende Barriere für eine gleichmäßige Besetzung aller drei Glycerinpositionen mit ungewöhnlichen Fettsäuren dar.

Dies ist wahrscheinlich die Ursache dafür, daß es trotz intensiver Zuchtprogramme nicht gelungen ist, z.B. den Erucasäuregehalt im Fettsäuregemisch des Rapsöls, das wie das anderer Brassicaceen von Natur aus reich an sehr langkettigen Fettsäuren ist, deutlich über 60% zu steigern. Daher muß Erucasäure, die seit langem im oleochemisch-technischen Bereich verwendet wird, zunächst kostenaufwendig gereinigt werden, was ihre Einsatzmöglichkeiten z. B. in der Kunststoffindustrie und damit ihren Absatzmarkt erheblich limitiert. Im Jahr 1993 lag das Marktvolumen für erucasäurereiches Rapsöl (Erucasäuregehalt  $\geq$  45%) in Deutschland z. B. bei ca. 28 000 t. Man erwartet, daß das Marktvolumen um das zehnfache ansteigen kann, sobald Öle mit Erucasäuregehalten um ca. 90% verfügbar werden.

Die homogene Besetzung aller drei Glycerinposition mit Erucasäure, wie auch mit anderen ungewöhnlichen Fettsäuren, kann im Öl von Kulturpflanzen, wie z. B. Raps, durch gentechnologische Methoden ermöglicht werden, z. B. durch Transformation mit einem Genkonstrukt daß für eine 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase mit gewünschten Eigenschaften kodiert. Solche Gene finden sich z. B. in bestimmten Wildpflanzen, in denen sie samenspezifisch exprimiert werden. Diese Gene kodieren für Acyltransferasen, die ungewöhnliche Fettsäuren auf die mittlere Glycerinposition übertragen, vor allem, wenn die sn-1-Position bereits mit einer solchen Fettsäure verestert ist. Samenspezifisch exprimierte Gene, die für sehr langkettige Acylgruppen spezifische 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferasen kodieren und die somit geeignet sind, das Fettsäurespektrum z. B. hinsichtlich Erucasäure zu vereinheitlichen, finden sich in *Limnanthes*-Arten.

Gene, die für 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferasen kodieren, wurden aus *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* isoliert, deren Aminosäuresequenzen zu 94% identisch sind (Tabelle 1). Weiterhin wurden cDNAs aus Hefe und Mais beschrieben, die eine *E. coli*-Mutante, die einen Defekt in ihrer 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase aufweist, komplementieren. Diese cDNAs kodieren für Polypeptide, deren Aminosäuresequenzen untereinander und zu denen der bakteriellen Acyltransferasen zu etwa 30% identisch sind (Tabelle 1). Ein eindeutiger Nachweis, daß diese cDNAs für 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferasen kodieren, steht allerdings noch aus.

Es ist Aufgabe der Erfindung, ein Nukleinsäurefragment zur Verfügung zu stellen, mit dem durch Expression in pflanzlichen Systemen die Qualität pflanzlicher Öle und Fette so verändert werden kann, daß ihre Verwertbarkeit als oleochemische Rohstoffe verbessert und erweitert wird. Diese Aufgabe wird mit einem Nukleinsäurefragment gemäß Patentanspruch 1 gelöst. Die Sequenz eines solchen Nukleinsäurefragments ist in FIG. 1 dargestellt.

Es wurde somit ein Verfahren erfunden, die Fettsäurezusammensetzung von Lipiden zu kontrollieren. Nukleinsäurefragmente, die für eine 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase (AGPAT) kodieren, werden bereitgestellt, um chimäre Gene zu erzeugen. Diese chimären Gene können benutzt werden, um Pflanzen oder Mikroorganismen zu transformieren und damit die Fettsäure-

zusammensetzung und Fettsäureverteilung der Glycerolipide und speziell der Triacylglycerine zu verändern.

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Nukleinsäurefragment, das eine DNA-Sequenz enthält, die für eine pflanzliche AGPAT oder ähnliches Enzym kodiert, deren Aminosäuresequenz eine Identität von mindestens 35 oder abgestuft mehr Prozent zu der aus *Limnanthes douglasii* isolierten und in FIG. 2 angegebenen Sequenz besitzt. Das isolierte Nukleinsäurefragment ist weiterhin dadurch charakterisiert, daß es aus einer zur Klasse der Dicotyledoneae gehörenden Pflanze isoliert wurde, daß es aus der Gruppe der folgenden Pflanzen isoliert wurde: *Limnanthes*, *Raps*, *Arabidopsis*.

Zum einen ist es überraschend, daß ein auf diese Weise aus Pflanzen gewonnenes Nukleinsäurefragment hinsichtlich der abgeleiteten Aminosäuresequenz keine deutlich höhere Ähnlichkeit zu der einzigen anderen aus Pflanzen bekannten Sequenz, nämlich der aus Mais, aufweist als zu den drei weiteren bekannten Sequenzen aus Bakterien und Hefe, sondern daß die Ähnlichkeit zu Hefe sogar etwas größer ist als die zu Mais (vgl. Tabelle 2).

Zum anderen ist es überraschend, daß durch dieses Verfahren ein cDNA-Klon gewonnen werden konnte, der aus Pflanzen, also einem Eukaryoten, stammt und für eine AGPAT kodiert, die an der Speicherlipidsynthese beteiligt ist und spezifisch für sehr langkettige Fettsäuren (d.h. Fettsäuren mit einer Kohlenstoffzahl von über 18) ist, weil die für den Komplementationsschritt verwendete Mutante ein Bakterium, also ein Prokaryot, ist und der Defekt in der Membranbiosynthese vorliegt.

Das aus *Limnanthes douglasii* isolierte Nukleinsäurefragment (FIG. 1) ist dadurch charakterisiert, daß die zugehörigen Gene samenspezifisch exprimiert werden und daß es für eine AGPAT kodiert, die spezifisch für sehr langkettige Acylgruppen ist - im folgenden wird dieses Enzym als L-AGPAT bezeichnet.

Das isolierte Nukleinsäurefragment ist vor allem dadurch charakterisiert, daß es dazu verwendet werden kann, den Gehalt an Trierucin im Öl transgener Pflanzen zu steigern und damit seine technische Verwertbarkeit zu verbessern. Tri rucin hat den wissenschaftlichen Namen Trierucoylglycerin.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung des Nukleinsäurefragments zur Isolierung von Genen oder cDNAs, die für andere pflanzliche Acyltransferasen kodieren, z. B. Verwendung des Nukleinsäurefragments bzw. Teile davon als Hybridisierungsprobe, Verwendung von aus der Sequenz des Nukleinsäurefragments abgeleiteten Oligonukleotiden in der Polymerasekettenreaktion (PCR), und Verwendung von Antikörpern gegen ein Polypeptid, das von dem Nukleinsäurefragment bzw. Derivaten dieses Fragments kodiert wird.

Die Erfindung betrifft ebenfalls alle Plasmide, Viren und andere Vektoren, die das isolierte Nukleinsäurefragment oder Teile davon enthalten, sowie alle Organismen, insbesondere Pflanzen und Pflanzenteile, die diese Konstrukte enthalten, sowie alle Produkte, die in den transgenen Organismen hergestellt werden und deren stoffliche Zusammensetzung durch die Wirkung der o.g. Sequenzen oder Teilen davon verändert ist. Von besonderem Interesse sind solche Plasmide (chimäre Gene), die Transkription oder Transkription und Translation (Expression) von pflanzlichen Acyltransferasen in Wirtszellen, vor allem pflanzlichen Zellen, ermöglichen. Diese chimären Gene umfassen Nukleinsäurefragmente, die für eine pflanzliche AGPAT oder ein ähnliches Enzym kodieren, deren Aminosäuresequenz eine Identität von mindestens 35 oder mehr Prozent zu der in FIG. 2 angegebenen Sequenz besitzt, sowie geeignete Steuersequenzen, die in funktionaler Weise mit dem Fragment verbunden sind, das seinerseits in "Sense" oder "Antisense" eingefügt sein kann. Auf Mikroorganismen, Zellkulturen, Pflanzen und Pflanzenteile, die diese chimären Gene enthalten, sowie auf daraus gewonnene Produkte, speziell Triacylglycerin, deren stoffliche Zusammensetzung durch Wirkung dieser chimären Gene in spezifischer Weise verändert ist, wird ebenfalls Schutzanspruch erhoben.

Die Erfindung betrifft auch eine Methode zur Produktion von Lipiden, die veränderte Gehalte oder veränderte Verteilungen sehr langkettiger Fettsäuren, speziell Erucasäure, aufweisen. Diese Methode umfaßt folgende Schritte:

- (a) Transformation von Zellen mit einem chimären Gen, wie oben beschrieben,
- (b) Isolierung transgener Zelllinien (Klone), wie unter (a) beschrieben,
- (c) Selektion von Zelllinien aus (b), deren Lipide die gewünschten Fettsäuren

- 6 -

remuster aufweisen,

(d) Verarbeitung der Zellen aus (c), um Lipide mit gewünschten Fettsäuremustern zu erhalten.

Bevorzugte Zellen sind solche aus der folgenden Gruppe: E.coli, Saccharomyces, pflanzliche Zellen. Die Zelllinien und Produkte, die mit Hilfe dieser Methode hergestellt werden, sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Die Erfindung betrifft ebenso eine Methode zur Produktion pflanzlicher Öle und Fette, die veränderte Gehalte oder veränderte Verteilungen sehr langkettiger Fettsäuren, speziell Erucasäure, in ihren Fettsäurespektren aufweisen. Von besonderem Interesse ist hierbei die Produktion pflanzlicher Öle und Fette mit veränderten Gehalten an Trierucin.

Diese Methode umfaßt folgende Schritte:

- (a) Transformation einer Pflanzenzelle mit einem chimären Gen, wie oben beschrieben,
- (b) Aufzucht fertiler Pflanzen aus Zellen, wie unter (a) beschrieben,
- (c) Selektion von Samen der Nachkommenschaft aus (b), deren Samenöle die gewünschten Fettsäuremuster aufweisen, und
- (d) Verarbeitung der Samen aus (c), um Öl mit gewünschten Fettsäuremustern zu erhalten.

Pflanzenzellen von Ölpflanzen, wie z. B. Raps, Sonnenblume oder Lein, sind bevorzugt. Bevorzugte Methoden zur Pflanzenzelltransformation sind indirekter DNA-Transfer mit Ti- und Ri-Plasmiden von Agrobacterium, direkter DNA-Transfer, Elektroporation oder ballistischer DNA-Transfer.

Die Erfindung betrifft auch die transgenen Pflanzen und Pflanzenteile, die mit Hilfe dieser Methode hergestellt wurden, und die aus den transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenteilen durch Pressen und/oder Extrahieren gewonnenen Öle und Fette mit veränderten Fettsäurespektren.

Die Erfindung beinhaltet ebenfalls eine Methode zur Pflanzenzüchtung, um die veränderte Qualität der Öle und Fette von Ölseen zu erhalten.

Die Methode umfaßt die folgenden Schritte:

- (a) Kreuzung der o. g. transgenen Pflanzen mit verschiedenen, anderen Varietäten,
- (b) Southernblot-Hybridisierungen von Restriktionsendonukleasen verdaut r genomischer DNA aus (a) mit markierten Nukleinsäurefragmenten, die für die beanspruchten AGPATs kodieren.



- 7 -

Die Erfindung betrifft auch alle mit Hilfe dieser Methode hergestellten Pflanzen und deren Nachkommen, sowie Teile davon und daraus hergestellte Produkte, insbesondere Triacylglycerine, soweit deren stoffliche Zusammensetzung durch die Wirkung der eingefügten Nukleinsäurefragmente verändert ist.

Schließlich beinhaltet die Erfindung eine Methode, um weitere Nukleinsäurefragmente zu isolieren, die für AGPAT und verwandte Enzyme kodieren.

Sie umfaßt die folgenden Schritte:

Vergleich der Sequenz in FIG. 2 mit anderen Acyltransferase-Aminosäuresequenzen;

Identifizierung konservierter Bereiche (a); und

Herstellung regionsspezifischer Oligonukleotidsonden, um die o.g. Nukleinsäurefragmente mit Hilfe sequenzabhängiger Protokolle herzustellen.

Die mit Hilfe dieser Methode hergestellten Nukleinsäurefragmente sowie Teile davon sind ebenfalls Teile der Erfindung, gleichermaßen alle chimären Gene, die diese Fragmente oder Teile davon enthalten, alle transgenen Mikroorganismen, Zelllinien und transgenen Pflanzen sowie Teile davon, die o. g. Nukleinsäurefragmente enthalten und schließlich auch alle Produkte, die aus diesem transgenen Material hergestellt werden und deren stoffliche Zusammensetzung durch die Wirkung der eingefügten Nukleinsäurefragmente verändert ist.

Die Figuren und Tabellen dienen zur Erläuterung der vorliegenden Erfindung. Sie zeigen:

FIG. 1. DNA-Sequenz des Nukleinsäurefragments pCH21, das aus einer cDNA-Expressionsbibliothek von sich entwickelnden Embryonen von *Limnanthes douglasii* isoliert wurde. Sie hat eine Länge von 1020 Basenpaaren (bp) plus einer PolyA-Sequenz von 19 bp, einem GC-Gehalt von 41,9% und enthält eine offene Leseraster von Position 1 bis 852. Start- bzw. Stopcodon finden sich bei den Positionen 10 bis 12 bzw. 853 bis 855.

FIG. 2. Aminosäuresequenz im Ein-Buchstaben-Code, die aus der DNA-Sequenz des Nukleinsäurefragments pCH21 abgeleitet wurde und die für eine L-AGPAT mit einer molekularen Masse von 27,5 kDa kodiert.

FIG. 3. Sequenzvergleich des 5'-Bereichs des Nukleinsäurefragments pCH21

mit dem eines weiteren aus der cDNA-Expressionsbibliothek von sich entwickelnden Embryonen von *Limnanthes douglasii* isolierten Nukleinsäurefragments pCH149. Das Startcodon (\*\*\*) und das stromaufwärts im selben Leseraster gelegene Stopcodon (+++) sind markiert.

FIG. 4. Vergleich der Aminosäuresequenzen der AGPAT von *E. coli* (Zeile 1) und *Salmonella typhimurium* (Zeile 2), sowie der aus den cDNAs von Hefe (Zeile 3) und der von Mais (Zeile 4) abgeleiteten mit der in FIG. 2 angegebenen. "\*" bedeutet identische Aminosäuren in allen Sequenzen, "." bedeutet ähnliche Aminosäuren in allen Sequenzen. Der Vergleich wurde mit Hilfe des Programms CLUSTAL (Higgins & Sharp 1988, *Gene* 73, 237-244) durchgeführt.

FIG. 5. Nachweis der samenspezifischen Expression durch Northernblot-Analyse. Elektrophoretisch aufgetrennte mRNA aus Blättern (Spur 1: 1 µg; Spuren 3 und 6: 3 µg) und reifenden Samen (Spur 2: 1 µg; Spuren 4 und 5: 3 µg) von *Limnanthes douglasii* wurde hybridisiert, wobei der Bereich von Nukleotid 10 bis Nukleotid 741 des in FIG.1 angegebenen Nukleinsäurefragments pCH21 als radioaktiv markierte Probe verwendet wurde.

Tab. 1: Vergleich der Aminosäureidentitäten der bekannten AGPATs. Es bedeuten ECO *Escherichia coli*, SAL *Salmonella typhimurium*, SAC *Saccharomyces cerevisiae* und ZEA *Zea mays*. Die Werte wurden mit Hilfe des Programms BESTFIT (Devereux et al. 1984, *Nuc. Acids Res.* 12, 387-394) ermittelt.

Tab. 2: Vergleich der Aminosäureidentitäten der bekannten AGPATs. Bezeichnung wie in Tab. 1, LIM *Limnanthes douglasii*.

Die Erfindung wird im folgenden an Beispielen erläutert:

Alle molekularbiologischen Methoden wie DNA (Plasmid)-Isolierung, Agarosegelelektrophorese, Gelelution, Phenolisierung, DNA-Füllungen, Ligation, Transformation, Klonierung, Polymerasekettenreaktion (PCR), wenn nicht anders angegeben, nach Standardprotokollen von Sambrook et al. (*Molecular Cloning*, CSH Laboratory Press 1989) durchgeführt.

Beispiel A: Isolierung von cDNAs für eine L-AGPAT mittels heterologer Komplementation.

### 1. Präparation von PolyA+RNA aus *Limnanthes douglasii*:

Zur Gewinnung von PolyA+RNA wurden 4 g Embryonen (ca. 10 Tage alt) von *Limnanthes douglasii* unter flüssigem Stickstoff fein zermörkert und mit 30 ml Extraktionspuffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris pH 9,0, 10 mM EDTA, 2 % (w/v) SDS, 200 µg/ml Proteinase K) versetzt. Nach 10minütiger Inkubation bei 37 °C folgten mit jeweils gleichen Volumina zwei Phenol/Chloroform (1:1)-Extraktionen und eine Chloroform-Extraktion. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation bei 6000 x g erreicht. Nach Zusatz von 1/5 Vol 10 M LiCl<sub>2</sub> und einstündiger Inkubation auf Eis wurde eine Zentrifugation bei 6500 x g, 4 °C, für 30 min angeschlossen und der Überstand mit 0,2 g Oligo-dT-Cellulose (Boehringer) versetzt. Die Cellulose wurde je dreimal mit Waschpuffer 1 (400 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5, 0,2 % (w/v) SDS) und Waschpuffer 2 (100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5) gewaschen und die mRNA mit Elutionspuffer (10 mM Tris pH 7,5) eluiert. Die eluierte mRNA wurde ein zweites Mal über Oligo-dT-Cellulose, wie oben erläutert, gereinigt. Die Ausbeute betrug 20 µg RNA pro 4 g eingesetztem Frischgewicht.

### 2. Erstellung einer cDNA-Expressionsbibliothek von *Limnanthes douglasii*:

Zur Isolierung von cDNAs, die für 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferasen kodieren, wurde von *Limnanthes douglasii* eine cDNA-Expressionsbibliothek im Phagenvektor Lambda-ZAP (Stratagene) angelegt. Hierzu wurden 2 µg mRNA eingesetzt, die, wie unter Punkt 1 beschrieben, aus reifenden Embryonen von *Limnanthes douglasii* isoliert wurden. Die Erstellung der Genbank erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Primärbank enthält  $3,7 \times 10^6$  unabhängige Klone in einem Volumen von 500 µl.  $1 \times 10^6$  Klone (= 135 µl) der Primärbank wurden entsprechend den Herstellerangaben amplifiziert. Diese amplifizierte Bank enthält  $2 \times 10^{13}$  Klone in 200 ml. Davon wurde 1 µl (=  $10^8$  Klone) in Phagemids überführt, die in einem Volumen von 3 ml vorlagen. Mit 5 µl Phagemidsuspension (=  $1,66 \times 10^5$  Klone) wurden Bakterienzellen transfiziert und aus diesen die entstandene Plasmid-DNA isoliert. Diese als Plasmid-cDNA-Expressionsbibliothek bezeichnete Präparation hat eine DNA-Konzentration von 1 µg/µl.

### 3. Heterologe Komplementation:

Das Problem ist die Isolierung solcher Klone, die AGPAT kodierende cDNAs enthalten, aus der Masse der verschiedenen Klone, die andere cDNAs der Genbank enthalten. Hierzu wurde die Methode der heterologen Komplemen-

- 10 -

tation gewählt. Bei der heterologen Komplementation wird auf Mutanten zurückgegriffen, die einen Defekt in dem Enzym aufweisen, dessen zugehörige cDNA gesucht wird. Die verwendeten Mutanten sind in der Regel konditional. Es gibt also permissive Bedingungen, unter denen das Wachstum der Zellen möglich ist, und nicht-permissive Bedingungen, unter denen kein Wachstum stattfindet. Wird nun in eine solche Mutante eine ganze Genbank im Schrotschußverfahren transformiert und werden die transformierten Zellen dann unter nicht-permissiven Bedingungen angezogen, dann kann es in einigen wenigen Fällen zum Wachstum kommen und zwar dann, wenn die eingeführte cDNA für eine AGPAT kodiert, diese cDNA hinreichend vollständig ist, die Klonierung in der richtigen Orientierung bezüglich des Expressionspromotors und im richtigen Leseraster erfolgte und daß heterologe, aus der Genbank also von einem fremdem Organismus stammende Protein in den Bakterien hinreichend stabil ist und in den fremden Umgebungsbedingungen enzymatisch aktiv ist. Derartige heterologe Komplementationen sind bislang in einigen Fällen erfolgreich durchgeführt worden, wie in der Literatur belegt ist.

Im vorliegenden Fall wurde die Mutante JC201 eingesetzt. Diese Mutante besitzt einen Defekt in der AGPAT, der thermosensitiv ist. Bei 30 °C können die Zellen wachsen, bei 37 °C Anzuchttemperatur dagegen findet kein Wachstum statt, AGPAT-Aktivität ist in vitro nicht mehr nachweisbar, und es häuft sich 1-Acylglycerin-3-phosphat in den Mutantenzellen an. Zellen dieser Mutante wurden nach der Methode von Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. et al. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene 96, 23-86 in den Zustand der Kompetenz überführt, in dem sie Plasmid-DNA aufnehmen können. Für die heterologe Komplementation wurden jeweils 200 µl der kompetenten Mutantenzellen mit 100 ng Plasmid-DNA der Plasmid-cDNA-Expressionsbibliothek von *Limnanthes douglasii* transformiert (Cohen, S. N., Chang, A.C.Y., Hsu, L. et al. 1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 2110-2114 und unter selektiven Bedingungen auf 100 µg/ml Ampicillin haltigen LB-Platten bei 37 °C inkubiert. Es wurden 300 Klone isoliert, die bei 37 °C wachsen konnten. Aus diesen Klonen wurden die Plasmid-DNA isoliert. Diese DNA wurde dann einzeln in kompetente JC201 transformiert, und die transformierten Zellen wurden auf ihre Fähigkeit getestet, bei der nicht-permissiven Temperatur von 37 °C zu wachsen. Dieses war bei 130 Klonen der Fall. Die zu diesen

- 11 -

130 Klonen gehörende DNA wurde erneut in kompetente JC201 transformiert und die Selektion wiederholt. Nach diesem Schritt zeigten noch 27 Klone reproduzierbar die Fähigkeit, bei 37 °C zu wachsen. In einer weiteren Runde reduzierte sich die Zahl der positiven Klone auf 9. Diese Zahl blieb dann in drei weiteren Selektionsrunden stabil.

#### 4. Analyse der cDNA der positiven Klone:

Die aus den positiven Klonen isolierte Plasmid-DNA wurde mit Hilfe der Restriktionsanalyse näher charakterisiert. Die Plasmid-DNA aus sechs der Klone (pCH21, pCH147, pCH148, pCH149, pCH170 und pCH186), deren cDNA etwa 1 kbp lang ist, wurden aufgrund ähnlicher Restriktionsmuster in einer Gruppe zusammengefaßt und von den beiden Seiten her ansequenziert. Es erwies sich, daß die cDNAs identische Nukleotidsequenzen beeinhalteten und sich lediglich in ihrer 5'- und 3'-Ausdehnung unterscheiden.

#### 5. pCH21:

Das cDNA-Insert von pCH21 wurde vollständig auf beiden Strängen sequenziert. Die Nukleotidsequenz ist in FIG. 1 dargestellt. Die enthaltene cDNA hat eine Länge von 1039 bp. In gleicher Orientierung wie der lacZ-Promoter findet sich ein langes, offenes Leseraster von 852 bp, daß sich in derselben Phase wie LacZ' befindet und daher potentiell ein Fusionsprotein bildet. Einschließlich des Stopkodons finden sich 279 Basenpaare im 3'-nicht-translatierten Bereich sowie ein PolyA-Bereich von 19 Nukleotiden. Die Nukleotidsequenz weist einen GC-Gehalt von 41,9% auf, der typisch für pflanzliche cDNAs ist. Die Translation eukaryoter mRNAs beginnt an dem am weitesten 5' gelegenen Startkodon (AUG = ATG in der cDNA). Legt man daß erste in der Sequenz von pCH21 vorkommende ATG zugrunde so ergibt sich aus der folgenden Sequenz ein potentielles Polypeptid von 281 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 27,5 kDa. Die Aminosäuresequenz ist in FIG. 2 im Einbuchstabencode dargestellt

#### 6. Vollständigkeit des Leserasters:

Auf Grund der Herstellung von cDNA-Klonen sind diese am 5'-Ende unvollständige Kopien der zugehörigen mRNA, die in der Länge ihrer 5'-Enden variieren. Dieses ist auch für die sechs oben erwähnten cDNAs der Fall, die in ihrer Sequenz - wie bereits festgestellt wurde - identisch sind. Es ist also mit Sicherheit davon auszugehen, daß die cDNAs Kopien der mRNA eines Gens darstellen. Da also pCH21 nicht vollständig ist und auch vor

- 12 -

dem ersten Startkodon bei Position 10 einen offenen Leserahmen aufweist, stellt sich die Frage, ob es weiter in 5'-Richtung ein weiteres Startkodon gibt, so daß die in FIG. 2 gezeigte Sequenz nicht die vollständige Sequenz die AGPAT darstellt. Die Sequenz von pCH148 und pCH149, die weiter in 5'-Richtung ausgedehnt ist, zeigt aber in dem zur Debatte stehenden Leserahmen in 5'-Richtung ein Stopkodon (FIG. 3). Damit ist der offene Leserahmen in 5'-Richtung begrenzt, und es ist mit Sicherheit davon auszugehen, daß das Startkodon bei Position 10 in pCH21 das Startkodon der AGPAT darstellt.

Beispiel B: Funktionale Expression der 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase von *Limnanthes douglasii* in *E. coli*

Zum Nachweis, daß es sich beim cDNA-Insert von pCH21 um eine 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase, und zwar um eine Erucoyl-CoA-spezifische, handelt, wurden funktionale Expressionsstudien in *E. coli* durchgeführt und die Acyl-CoA-Spezifitäten des Expressionsproduktes analysiert.

#### 1. Konstruktion des Expressionsplasmids pQEL21:

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde das cDNA-Insert von pCH21 (FIG. 1) amplifiziert. Als Oligonukleotidprimer dienten die folgenden beiden Primer A und B, die an ihren 5'-Enden Restriktionsschnittstellen für Nco I und Bgl II tragen.

Primer A 5' AAGATCTATTTGAGCGATTGTGC 3'  $T_m = 66^\circ\text{C}$

Primer B 5' ACCATGGCCAAACTAGAACTAGC 3'  $T_m = 70^\circ\text{C}$

Für einen 100 µl PCR-Ansatz wurden 10 ng pCH21, die Primer A und B in 1 µM Konzentration, 5 Units Taq-DNA-Polymerase (Gibco) und 100 µM dNTPs in einem Puffermilieu von 25 mM TAPS (pH 9,3), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0,5 mg/ml aktivierte Lachssperm-DNA eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (Biometra) bei folgenden Reaktionstemperaturen und -zeiten durchgeführt: 2 min,  $95^\circ\text{C}$  zum erstmaligen Denaturieren der DNA, gefolgt von 27 Zyklen mit jeweils 20 s  $95^\circ\text{C}$  zum Denaturieren der DNA, 20 s  $65^\circ\text{C}$  zur Hybridisierung der Primer und 1 min,  $72^\circ\text{C}$  zur Amplifikation der DNA. Anschließend wurden alle DNA-Moleküle 3 min bei  $72^\circ\text{C}$  vollständig amplifiziert. Das 852 bp große Amplifikationsprodukt wurde über Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al. 1989) von Primern

- 13 -

und Nebenprodukten abgetrennt, mit Hilfe des QIAEX-Gelelutionskits (QIAGEN) nach Firmenvorschrift aus dem Gel eluiert und unter Verwendung des SUREclonkits (Pharmacia), wie durch den Hersteller angegeben, in den mit Sma I linearisierten, dephosphorylierten Vektor pUC19 ligiert. Das so erhaltene Plasmid pUCL21 wurde durch Restriktions- und Sequenzanalyse überprüft. Anschließend wurden 10 µg des Plasmids mit Nco I und Bgl II verdaut, daß das cDNA-Insert tragende Nco I/Bgl II-Fragment, wie oben beschrieben, durch Agarosegelelektrophorese isoliert und in den mit Nco I und Bgl II linearisierten Vektor pQE60 (QIAGEN) ligiert, um daß Konstrukt pQEL21 zu erhalten. pQEL21 bzw. der Vektor pQE60 wurden in kompetente Zellen der E. coli-Mutante JC201, die daß den lac I<sup>q</sup>-Repressor tragende Plasmid pREP4 (QIAGEN) enthielten, transformiert.

## 2. Anzucht der transgenen E. coli-JC201-Zellen:

Die Anzucht der E. coli-JC201-Zellen, die neben dem Repressorplasmid auch das Konstrukt pQEL21 bzw. den Vektor pQE60 enthielten, erfolgte in Ampicillin (100 µg/l) und Kanamycin (25 µg/l) haltigem LB-Medium bei 30 °C. Übernachtskulturen wurden in diesem Medium 1:40 verdünnt und bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen. Zur Induktion des Expressionskonstruktes pQEL21 wurde Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 2 mM hinzugefügt und die Bakterien nach einer dreistündigen Inkubation bei 30 °C durch Zentrifugation bei 4500 x g für 10 min geerntet.

## 3. Membranisolierung aus transgenen E. coli-JC201-Zellen:

Alle folgenden Schritte wurden bei 0-4 °C durchgeführt: Durch Sedimentation geerntete Bakterienzellen wurden zweimal mit Membranpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Dithiotreitol) gewaschen und in diesem Puffer so resuspendiert, daß das Volumen der Suspension etwa 1/40 des Kulturvolumens entsprach. Das Lysieren der Bakterienzellen erfolgte durch viermalige Ultraschallbehandlung für 30 s mit Hilfe eines Ultraschallstabes. Nach Abtrennung großer Zellfragmente und "inclusion bodies" durch 10minütige Zentrifugation bei 7500 x g, wurden die Membranen aus den Zellhomogenaten durch Zentrifugation bei 10000 x g für 1 h sedimentiert, in wenig Membranpuffer resuspendiert und mit Glycerin in einer Endkonzentration von 50% (v/v) bei -20 °C gelagert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (Anal. Biochem. 72, 248-254 (1987)).

- 14 -

#### 4. Enzymtest zur Bestimmung der 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferaseaktivität:

Der Enzymtest basiert auf der enzymatischen Umsetzung von 1-Acyl-sn-[U-<sup>14</sup>C]glycerin-3-phosphat mit Acyl-CoA zu 1,2-Diacyl-sn-[U-<sup>14</sup>C]glycerin-3-phosphat. Das Reaktionsgemisch enthielt 0,1 M Tricin/NaOH pH 8,8, 4 bis 40 µM Oleoyl-CoA bzw. Erucoyl-CoA, 2,5 µM 1-Oleoyl-sn-[U-<sup>14</sup>C]glycerin-3-phosphat (353 dpm/pmol) und Membranfraktionen (0,2-3,5 µg Protein) in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Nach einer 15minütigen Inkubation bei 30 °C wurde der Ansatz mit 50 µg Phosphatidsäure in 240 µl Chloroform:Methanol (1:1) und 100 µl 1 M KCl, 0,2 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> versetzt, gemischt und zur Phasentrennung 2 min bei 1000 x g zentrifugiert, 90 µl der Chloroformphase auf Kieselgelfertigplatten aufgetragen und in Chloroform:Pyridin:Ameisensäure (50:30:7) 30 min entwickelt. Die Phosphatidsäurebande wurde durch Besprühen der entwickelten Kieselgelfertigplatte mit Phosphatidreagenz (Dittmer & Lester, J. Lipid Res. 5, 126-127 (1964)) lokalisiert, in ein Szintillationsröhrchen geschabt und mit 5 ml Cocktail (OptiPhase 4HISAFE4, Wallec) versetzt. Die Radioaktivität der Probe wurde im Szintillationszähler bestimmt.

Aus diesen Werten wurden die spezifischen Enzymaktivitäten als pmol gebildetes 1,2-Diacylglycerin-3-phosphat pro min und mg Membranprotein berechnet. Bei Enzymtests mit Membranfraktionen aus pQE60-haltigen JC201-Zellen war weder mit Oleoyl-CoA noch mit Erucoyl-CoA eine Umsetzung von 1-Acyl-sn-[U-<sup>14</sup>C]glycerin-3-phosphat zu 1,2-Diacyl-sn-[U-<sup>14</sup>C]glycerin-3-phosphat nachweisbar. Die Membranfraktionen aus pQEL21-haltigen JC201-Zellen katalysierten dagegen diese Umsetzung und zeigten mit Erucoyl-CoA höhere spezifische Enzymaktivität als mit Oleoyl-CoA (200 pmol/min/mg Protein mit Erucoyl-CoA und 84 pmol/min/mg Protein mit Oleoyl-CoA). Diese Ergebnisse belegen somit, daß das cDNA-Insert von pCH21 für eine Erucoyl-CoA spezifische 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase kodiert also für die Acyltransferase, die in *Limnanthes* samenspezifisch exprimiert wird. Diese Ergebnisse werden durch Northern-Blot-Analysen gestützt (FIG. 5). Sie zeigen, daß das zu pCH21 zugehörige Gen in Samen aber nicht in Blättern transkribiert wird.



- 15 -

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

(A) NAME: Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke  
KG

(B) STRASSE: Hohenlieth

(C) ORT: Holtsee

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: 24363

(A) NAME: Deutsche Saatveredelung Lippstadt-Bremen GmbH

(B) STRASSE: Weissenburger Str. 5

(C) ORT: Lippstadt

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: 59524

(A) NAME: KWS Kleinwanzlebener Saatzucht AG, vorm.  
Rabbethge und Geisecke

(B) STRASSE: Grimsehlstr. 31

(C) ORT: Einbeck

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: 37574

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Nukleinsaeurefragment und daraus  
abgeleitete Produkte

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 10

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1039 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Doppelstrang

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

## (ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LÄNGE: 10..852

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GTTCTATTC	ATG	GCC	AAA	ACT	AGA	ACT	AGC	TCT	CTC	CGC	AAC	AGG	AGA	48
	Met	Ala	Lys	Thr	Arg	Thr	Ser	Ser	Leu	Arg	Asn	Arg	Arg	
	1				5					10				

CAA	CTA	AAG	CCG	GCT	GTA	GCT	GCT	ACT	GCT	GAT	GAT	GAT	AAA	GAT	GGG	96
Gln	Leu	Lys	Pro	Ala	Val	Ala	Ala	Thr	Ala	Asp	Asp	Asp	Lys	Asp	Gly	
	15				20					25						

GTT TTT ATG GTA TTG CTA TCG TGT TTT AAA ATT TTT GTT TGC TTT GCC Val Ph Met Val Leu Leu Ser Cys Phe Lys Ile Phe Val Cys Phe Ala 30 35 40 45	144
ATA GTG TTG ATC ACC GCG GTG GCA TGG GGA CTA ATC ATG GTC TTG CTC Ile Val Leu Ile Thr Ala Val Ala Trp Gly Leu Ile Met Val Leu Leu 50 55 60	192
TTA CCT TGG CCT TAT ATG AGG ATT CGA CTA GGA AAT CTA TAC GGC CAT Leu Pro Trp Pro Tyr Met Arg Ile Arg Leu Gly Asn Leu Tyr Gly His 65 70 75	240
ATC ATT GGT GGA TTA GTG ATA TGG ATT TAC GGA ATA CCA ATA AAG ATC Ile Ile Gly Gly Leu Val Ile Trp Ile Tyr Gly Ile Pro Ile Lys Ile 80 85 90	288
CAA GGA TCC GAG CAT ACA AAG AAG AGG GCC ATT TAT ATA AGC AAT CAT Gln Gly Ser Glu His Thr Lys Lys Arg Ala Ile Tyr Ile Ser Asn His 95 100 105	336
GCA TCT CCT ATC GAT GCT TTC TTT GTT ATG TGG TTG GCT CCC ATA GGC Ala Ser Pro Ile Asp Ala Phe Phe Val Met Trp Leu Ala Pro Ile Gly 110 115 120 125	384
ACA GTT GGT GTT GCA AAG AAA GAG GTT ATA TGG TAT CCG CTG CTT GGA Thr Val Gly Val Ala Lys Lys Glu Val Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Gly 130 135 140	432
CAA CTA TAT ACA TTA GCC CAT CAT ATT CGC ATA GAT CGG TCA AAC CCG Gln Leu Tyr Thr Leu Ala His His Ile Arg Ile Asp Arg Ser Asn Pro 145 150 155	480
GCT GCG GCT ATT CAG TCT ATG AAA GAG GCA GTT CGT GTA ATA ACC GAA Ala Ala Ala Ile Gln Ser Met Lys Glu Ala Val Arg Val Ile Thr Glu 160 165 170	528
AAG AAT CTC TCT CTG ATT ATG TTT CCA GAG GGA ACC AGG TCG AGA GAT Lys Asn Leu Ser Leu Ile Met Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Arg Asp 175 180 185	576
GGG CGT TTA CTT CCT TTC AAG AAG GGT TTT GTT CAT CTA GCA CTT CAG Gly Arg Leu Leu Pro Phe Lys Lys Gly Phe Val His Leu Ala Leu Gln 190 195 200 205	624
TCA CAT CTC CCA ATA GTT CCG ATG ATC CTT ACA GGT ACA CAT TTA GCA Ser His Leu Pro Ile Val Pro Met Ile Leu Thr Gly Thr His Leu Ala 210 215 220	672
TGG AGG AAA GGT ACC TTC CGT GTC CGG CCA GTA CCC ATC ACT GTC AAG Trp Arg Lys Gly Thr Phe Arg Val Arg Pro Val Pro Ile Thr Val Lys 225 230 235	720
TAC CTT CCT CCT ATA AAC ACT GAT GAT TGG ACT GTT GAC AAA ATC GAC Tyr Leu Pro Pro Ile Asn Thr Asp Asp Trp Thr Val Asp Lys Ile Asp 240 245 250	768
GAT TAC GTC AAA ATG ATA CAC GAC GTC TAT GTC CGC AAC CTA CCT GCG Asp Tyr Val Lys Met Ile His Asp Val Tyr Val Arg Asn Leu Pro Ala 255 260 265	816
TCT CAA AAA CCA CTT GGT AGC ACA AAT CGC TCA AAT TGAGTCCCTC Ser Gln Lys Pro Leu Gly Ser Thr Asn Arg Ser Asn 270 275 280	862

- 17 -

TTTGCTCTAA GGTTAGCAGA ATGGATACGT ACTGTTGTCT TGCTGCATGA AAAGTTTAAT 922  
 CCTTTCCTTAT GATATTAGAT TACAGCGTAA GACTTTCATG TTAAAATAGT GTAACAGTGC 982  
 TTCTGGTTTG TAACTTTTAC AATAAAAGTA TGCTTTTGAA AAAAAAAAAA AAAAAAA 1039

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 281 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ala Lys Thr Arg Thr Ser Ser Leu Arg Asn Arg Arg Gln Leu Lys  
 1 5 10 15  
 Pro Ala Val Ala Ala Thr Ala Asp Asp Lys Asp Gly Val Phe Met  
 20 25 30  
 Val Leu Leu Ser Cys Phe Lys Ile Phe Val Cys Phe Ala Ile Val Leu  
 35 40 45  
 Ile Thr Ala Val Ala Trp Gly Leu Ile Met Val Leu Leu Leu Pro Trp  
 50 55 60  
 Pro Tyr Met Arg Ile Arg Leu Gly Asn Leu Tyr Gly His Ile Ile Gly  
 65 70 75 80  
 Gly Leu Val Ile Trp Ile Tyr Gly Ile Pro Ile Lys Ile Gln Gly Ser  
 85 90 95  
 Glu His Thr Lys Lys Arg Ala Ile Tyr Ile Ser Asn His Ala Ser Pro  
 100 105 110  
 Ile Asp Ala Phe Phe Val Met Trp Leu Ala Pro Ile Gly Thr Val Gly  
 115 120 125  
 Val Ala Lys Lys Glu Val Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Leu Tyr  
 130 135 140  
 Thr Leu Ala His His Ile Arg Ile Asp Arg Ser Asn Pro Ala Ala Ala  
 145 150 155 160  
 Ile Gln Ser Met Lys Glu Ala Val Arg Val Ile Thr Glu Lys Asn Leu  
 165 170 175  
 Ser Leu Ile Met Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Arg Asp Gly Arg Leu  
 180 185 190  
 Leu Pro Phe Lys Lys Gly Phe Val His Leu Ala Leu Gln Ser His Leu  
 195 200 205  
 Pro Ile Val Pro Met Ile Leu Thr Gly Thr His Leu Ala Trp Arg Lys  
 210 215 220  
 Gly Thr Phe Arg Val Arg Pro Val Pro Ile Thr Val Lys Tyr Leu Pro  
 225 230 235 240  
 Pro Ile Asn Thr Asp Asp Trp Thr Val Asp Lys Ile Asp Asp Tyr Val  
 245 250 255

Lys Met Ile His Asp Val Tyr Val Arg Asn Leu Pro Ala Ser Gln Lys  
260 265 270

Pro Leu Gly Ser Thr Asn Arg Ser Asn  
275 280

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 255 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Doppelstrang  
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GTTCTATTCA	TGGCCAAAAC	TAGAACTAGC	TCTCTCCGCA	ACAGGAGACA	ACTAAAGCCG	60
GCTGTAGCTG	CTACTGCTGA	TGATGATAAA	GATGGGGTTT	TTATGGTATT	GCTATCGTGT	120
TTTAAATTT	TTGTTTGCTT	TGCCATAGTG	TTGATCACCG	CGGTGGCATG	GGGACTAATC	180
ATGGTCTTGC	TCTTACCTTG	GCCTTATATG	AGGATTTCGAC	TAGGAAATCT	ATACGGCCAT	240
ATCATTGGTG	GATTA					255

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 300 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Doppelstrang  
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CTAAATCTCT	CTTACTGAAT	TTTAGGTCAA	ACAATCTCAT	AGCCGGTTCT	ATTTCATGGCC	60
AAAAC TAGAA	CTAGCTCTCT	CCGCAACAGG	AGACAAC TAA	AGCCGGCTGT	AGCTGCTACT	120
GCTGATGATG	ATAAAGATGG	GGTTTTTATG	GTATTGCTAT	CGTGT TTTTAA	AATTTTTGTT	180
TGCTTTGCCA	TAGTGTTGAT	CACCGCGGTG	GCATGGGGAC	TAATCATGGT	CTTGCTCTTA	240
CCTTGGCCTT	ATATGAGGAT	TCGACTAGGA	AATCTATACG	GCCATATCAT	TGGTGGATTA	300

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 146 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM: nicht bekannt  
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

- 19 -

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Val Lys Val Gln Leu His Ala Asp Glu Glu Thr Tyr Arg Ser Met Gly  
 1 5 10 15  
 Lys Glu His Ala Leu Ile Ile Ser Asn His Arg Ser Asp Ile Asp Trp  
 20 25 30  
 Leu Ile Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly Ser Thr  
 35 40 45  
 Leu Ala Val His Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile Gly Trp  
 50 55 60  
 Ser His Trp Phe Ala Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Ser Trp Ala Lys  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Lys Thr Leu Lys Trp Gly Leu Gln Arg Leu Lys Asp Phe Pro  
 85 90 95  
 Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe Thr Pro  
 100 105 110  
 Ala Lys Leu Leu Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Gln Gly Leu Pro  
 115 120 125  
 Ala Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val Ser Ala  
 130 135 140  
 Val Ser  
 145

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 303 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
  - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Ser Val Ile Gly Arg Phe Leu Tyr Tyr Leu Arg Ser Val Leu Val  
 1 5 10 15  
 Val Leu Ala Leu Ala Gly Cys Gly Phe Tyr Gly Val Ile Ala Ser Ile  
 20 25 30  
 Leu Cys Thr Leu Ile Gly Lys Gln His Leu Ala Gln Trp Ile Thr Ala  
 35 40 45  
 Arg Cys Phe Tyr His Val Met Lys Leu Met Leu Gly Leu Asp Val Lys  
 50 55 60

- 20 -

Val 65	Val	Gly	Glu	Glu	Asn 70	Leu	Ala	Lys	Lys	Pro 75	Tyr.	Ile	Met	Ile	Ala 80
Asn	His	Gln	Ser	Thr 85	Leu	Asp	Ile	Phe	Met 90	Leu	Gly	Arg	Ile	Phe 95	Pro
Pro	Gly	Cys	Thr 100	Val	Thr	Ala	Lys	Lys 105	Ser	Leu	Lys	Tyr	Val 110	Pro	Phe
Leu	Gly	Trp 115	Phe	Met	Ala	Leu	Ser 120	Gly	Thr	Tyr	Phe	Leu 125	Asp	Arg	Ser
Lys	Arg 130	Gln	Glu	Ala	Ile	Asp 135	Thr	Leu	Asn	Lys	Gly 140	Leu	Glu	Asn	Val
Lys 145	Lys	Asn	Lys	Arg	Ala 150	Leu	Trp	Val	Phe	Pro 155	Glu	Gly	Thr	Arg	Ser 160
Tyr	Thr	Ser	Glu	Leu 165	Thr	Met	Leu	Pro	Phe 170	Lys	Lys	Gly	Ala	Phe 175	His
Leu	Ala	Gln	Gln	Gly 180	Lys	Ile	Pro	Ile	Val	Pro	Val	Val	Val	Ser	Asn
Thr	Ser	Thr 195	Leu	Val	Ser	Pro	Lys 200	Tyr	Gly	Val	Phe	Asn 205	Arg	Gly	Cys
Met	Ile 210	Val	Arg	Ile	Leu	Lys 215	Pro	Ile	Ser	Thr	Glu 220	Asn	Leu	Thr	Lys
Asp 225	Lys	Ile	Gly	Glu	Phe 230	Ala	Glu	Lys	Val	Arg 235	Asp	Gln	Met	Val	Asp 240
Thr	Leu	Lys	Glu	Ile 245	Gly	Tyr	Ser	Pro	Ala 250	Ile	Asn	Asp	Thr	Thr 255	Leu
Pro	Pro	Gln	Ala 260	Ile	Glu	Tyr	Ala	Ala 265	Leu	Gln	His	Asp	Lys 270	Lys	Val
Asn	Lys	Lys 275	Ile	Lys	Asn	Glu	Pro	Val	Pro	Ser	Val	Ser 285	Ile	Ser	Asn
Asp 290	Val	Asn	Thr	His	Asn 295	Glu	Gly	Ser	Ser	Val	Lys 300	Lys	Met	His	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 245 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM: nicht bekannt  
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Met Leu Tyr Ile Phe Arg Leu Ile Ile Thr Val Ile Tyr Ser Ile Leu  
1 5 10 15

- 21 -

Val Cys Val Phe Gly Ser Ile Tyr Cys Leu Phe Ser Pro Arg Asn Pro  
                   20                  25                  30  
 Lys His Val Ala Thr Phe Gly His Met Phe Gly Arg Leu Ala Pro Leu  
           35                  40                  45  
 Phe Gly Leu Lys Val Glu Cys Arg Lys Pro Thr Asp Ala Glu Ser Tyr  
       50                  55                  60  
 Gly Asn Ala Ile Tyr Ile Ala Asn His Gln Asn Asn Tyr Asp Met Val  
   65                  70                  75                  80  
 Thr Ala Ser Asn Ile Val Gln Pro Pro Thr Val Thr Val Gly Lys Lys  
                   85                  90                  95  
 Ser Leu Leu Trp Ile Pro Phe Phe Gly Gln Leu Tyr Trp Leu Thr Gly  
           100                  105                  110  
 Asn Leu Leu Ile Asp Arg Asn Asn Arg Thr Lys Ala His Gly Thr Ile  
       115                  120                  125  
 Ala Glu Val Val Asn His Phe Lys Lys Arg Arg Ile Ser Ile Trp Met  
   120                  135                  140  
 Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Arg Gly Arg Gly Leu Leu Pro Phe Lys  
   145                  150                  155                  160  
 Thr Gly Ala Phe His Ala Ala Ile Ala Ala Gly Val Pro Ile Ile Pro  
                   165                  170                  175  
 Val Cys Val Ser Thr Thr Ser Asn Lys Ile Asn Leu Asn Arg Leu His  
           180                  185                  190  
 Asn Gly Leu Val Ile Val Glu Met Leu Pro Pro Ile Asp Val Ser Gln  
   195                  200                  205  
 Tyr Gly Lys Asp Gln Val Arg Glu Leu Ala Ala His Cys Arg Ser Ile  
   210                  215                  220  
 Met Glu Gln Lys Ile Ala Glu Leu Asp Lys Glu Val Ala Glu Arg Glu  
   225                  230                  235                  240  
 Ala Ala Gly Lys Val  
                   245

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 245 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Leu Tyr Ile Phe Arg Leu Ile Val Thr Val Ile Tyr Ser Ile Leu  
 1                  5                  10                  15

- 22 -

Val Cys Val Phe Gly Ser Ile Tyr Cys Leu Phe Ser Pro Arg Asn Pro  
 20 25 30  
 Lys His Val Ala Thr Phe Gly His Met Phe Gly Arg Leu Ala Pro Leu  
 35 40 45  
 Phe Gly Leu Lys Val Glu Cys Arg Lys Pro Ala Asp Ala Glu Asn Tyr  
 50 55 60  
 Gly Asn Ala Ile Tyr Ile Ala Asn His Gln Asn Asn Tyr Asp Met Val  
 65 70 75 80  
 Thr Ala Ala Asn Ile Val Gln Pro Pro Thr Val Thr Val Gly Lys Lys  
 85 90 95  
 Ser Leu Leu Trp Ile Pro Phe Phe Gly Gln Leu Tyr Trp Leu Thr Gly  
 100 105 110  
 Asn Leu Leu Ile Asp Arg Asn Asn Arg Ala Lys Ala His Ser Thr Ile  
 115 120 125  
 Ala Ala Val Val Asn His Phe Lys Lys Arg Arg Ile Ser Ile Trp Met  
 130 135 140  
 Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Arg Gly Arg Gly Leu Leu Pro Phe Lys  
 145 150 155 160  
 Thr Gly Ala Phe His Ala Ala Ile Ala Ala Gly Val Pro Ile Ile Pro  
 165 170 175  
 Val Cys Val Ser Asn Thr Ser Asn Lys Val Asn Leu Asn Arg Leu Asn  
 180 185 190  
 Asn Gly Leu Val Ile Val Glu Met Leu Pro Pro Val Asp Val Ser Glu  
 195 200 205  
 Tyr Gly Lys Asp Gln Val Arg Glu Leu Ala Ala His Cys Arg Ala Leu  
 210 215 220  
 Met Glu Gln Lys Ile Ala Glu Leu Asp Lys Glu Val Ala Glu Arg Glu  
 225 230 235 240  
 Ala Thr Gly Lys Val  
 245

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "sythetische DNA"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

AAGATCTATT TGAGCGATTT GTGC



- 23 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetische DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

ACCATGGCCA AAAC TAGC

24

## Patentansprüche

1. Isoliertes Nukleinsäurefragment, welches eine Nukleinsäuresequenz enthält, die für die 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase oder ähnliche Enzyme kodiert, deren Aminosäuresequenz eine Identität von mindestens 35% zu der in Figur 2 dargestellten Sequenz besitzt.
2. Isoliertes Nukleinsäurefragment nach Anspruch 1, wobei die Identität der zugehörigen Aminosäuresequenz mindesten 40 %, vorzugsweise 45 %, insbesondere 50 % zu der in Figur 2 aufgeführten Sequenz beträgt.
3. Isoliertes Nukleinsäurefragment nach Anspruch 1, wobei die Identität der zugehörigen Aminosäuresequenz mindestens 65 %, vorzugsweise mindestens 90 % zu der in Figur 2 aufgeführten Sequenz beträgt.
4. Isoliertes Nukleinsäurefragment nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Aminosäuresequenz um die Sequenz gemäß Figur 2 handelt.
5. Isoliertes Nukleinsäurefragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es aus Pflanzen isoliert ist.
6. Isoliertes Nukleinsäurefragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es aus dikotyledonen Pflanzen isoliert ist.
7. Isoliertes Nukleinsäurefragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Ausgangsmaterial zur Isolierung Triacylglycerin synthetisierendes Gewebe ist.
8. Isoliertes Nukleinsäurefragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Ausgangsmaterial zur Isolierung reife Samen sind.
9. Isoliertes Nukleinsäurefragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Ausgangsmaterial zur Isolierung reife Samen von *Limnanthes douglasii* sind.

10. Isoliertes Nukleinsäurefragment nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es samenspezifisch exprimiert wird.
11. Plasmide, Viren oder andere Vektoren, dadurch gekennzeichnet, daß sie Nukleinsäurefragmente entsprechend einem der Ansprüche 1 bis 10 enthalten.
12. Genomische Klone, dadurch gekennzeichnet, daß sie Gene oder Teile von Genen enthalten, die für eine Sequenz oder Teile der Sequenz entsprechend einem der Ansprüche 1 bis 10 kodieren.
13. Chimäres Gen, das in der Lage ist, die Fettsäurezusammensetzung in einer transformierten Zelle zu verändern und ein Nukleinsäurefragment nach einem der Ansprüche 1 bis 10 enthält und das in wirksamer Form mit geeigneten Steuersequenzen verknüpft ist.
14. Chimäres Gen, das in der Lage ist, den Gehalt an sehr langkettigen, gesättigten und/oder ungesättigten Fettsäuren in einer transformierten Zelle zu verändern und ein Nukleinsäurefragment nach einem der Ansprüche 1 bis 10 enthält, das in wirksamer Form mit geeigneten Steuersequenzen verknüpft ist.
15. Chimäres Gen, das in der Lage ist, den Gehalt an Erucasäure in einer transformierten Zelle zu verändern, und ein Nukleinsäurefragment nach einem der Ansprüche 1 bis 10 enthält, das in wirksamer Form mit geeigneten Steuersequenzen verknüpft ist.
16. Chimäres Gen, das in der Lage ist, die Fettsäurezusammensetzung im Triacylglycerin einer transformierten Zelle zu verändern, und ein Nukleinsäurefragment nach einem der Ansprüche 1 bis 10 enthält, das in wirksamer Form mit geeigneten Steuersequenzen verknüpft ist.
17. Chimäres Gen, das in der Lage ist, den Gehalt an sehr langkettigen Fettsäuren im Triacylglycerin einer transformierten Zelle zu verändern, und ein Nukleinsäurefragment nach einem der Ansprüche 1 bis 10 enthält, das in wirksamer Form mit geeigneten Steuersequenzen verknüpft ist.

- 26 -

18. Chimäres Gen, das in der Lage ist, den Gehalt an Erucasäure im Triacylglycerin einer transformierten Zelle zu verändern, und ein Nukleinsäurefragment nach einem der Ansprüche 1 bis 10 enthält, das in wirksamer Form mit geeigneten Steuersequenzen verknüpft ist.
19. Chimäres Gen gemäß der Ansprüche 13 - 18, das in der Lage ist, die Synthese von Trierocin in einer transformierten Zelle zu ermöglichen, wobei das Gen ein Nukleinsäurefragment nach einem der Ansprüche 1 - 10 enthält, das in wirksamer Form mit geeigneten Steuersequenzen verknüpft ist.
20. Chimäres Gen entsprechend einem der Ansprüche 13 - 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Konstruktion in "Sense" und/oder "Antisense"-Orientierung vorliegt.
21. Transformierte Zellen, Pflanzen oder Pflanzenteile, die ein chimäres Gen entsprechend einem der Ansprüche 13 bis 20 enthalten.
22. Transformierte Zellen, Pflanzen oder Pflanzenteile entsprechend Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferasen (AGPAT) enthalten, die in diesen natürlicherweise nicht oder in anderer Form oder anderer Konzentration vorkommen.
23. Transformierte Zellen, Pflanzen oder Pflanzenteile entsprechend Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferaseaktivitäten enthalten, die in diesen natürlicherweise nicht oder in anderer Höhe oder mit anderer Spezifität vorkommen.
24. Transformierte Zellen, Pflanzen oder Pflanzenteile entsprechend Anspruch 21 dadurch gekennzeichnet, daß sie für sehr langkettige Acylgruppen spezifische 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferaseaktivitäten (L-AGPAT-Aktivitäten) enthalten, die in diesen natürlicherweise nicht oder in anderer Höhe vorkommen.
25. Transformierte Zellen, Pflanzen oder Pflanzenteile entsprechend Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie erucasäurespezifische 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferaseaktivitäten enthalten, die in diesen natürlicherweise nicht oder in anderer Höhe vorkommen.

26. Öl aus Samen oder Früchten von Pflanzen gewonnen, die ein chimäres Gen entsprechend der Ansprüche 13 bis 20 enthalten.

27. Öl, das aus Pflanzen oder Pflanzenteilen entsprechend einem der Ansprüche 21 bis 25 gewonnen ist.

28. Verfahren zur Herstellung von 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase umfassend:

- (a) Transformation einer Zelle mit einem chimären Gen entsprechend einem der Ansprüche 13 bis 20;
- (b) Selektion solcher Zellen, die das Protein in gewünschter Menge produzieren;
- (c) und vorzugsweise Reinigung des Proteins von anderen Bestandteilen.

29. 1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase erhältlich durch das Verfahren gemäß Anspruch 28.

30. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen und/oder Pflanzenöl mit einem veränderten Gehalt an sehr langkettigen Fettsäuren umfassend:

- (a) Transformation einer Pflanzenzelle einer ölproduzierenden Pflanze mit einem chimären Gen nach einem der Ansprüche 13 bis 20;
- (b) Aufzucht fertiler Pflanzen aus der transformierten Pflanzenzelle nach (a);
- (c) Selektion der Nachkommen der Pflanzen entsprechend (b), zur Erlangung des gewünschten Gehalts an sehr langkettigen Fettsäuren;
- (d) Verarbeitung der Samen der Pflanzen entsprechend (c), um Pflanzen und/oder Pflanzenöl zu erhalten, daß den gewünschten Gehalt an sehr langkettigen Fettsäuren aufweist.

31. Verfahren gemäß Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß die sehr langkettige Fettsäure Erucasäure ist.

32. Pflanze und/oder Pflanzenöl erhältlich durch das Verfahren gemäß Anspruch 30 oder 31.

33. Verfahren zum Gewinnen von Nukleinsäurefragmenten, die für Acyltransferasen und acyltransferaseähnliche Enzyme kodieren, umfassend die fol-

- 28 -

genden Schritte:

- (a) Vergleich der Aminosäuresequenz in Figur 2 mit den Aminosäuresequenzen anderer Acyltransferasen;
- (b) Identifizierung eines oder mehrerer konservierter Sequenzbereiche mit 4 oder mehr identischen Aminosäuren als Ergebnis von (a);
- (c) Herstellung spezifischer Oligonukleotide durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz nach (b);
- (d) Benutzung dieser Oligonukleotide, um mit Hilfe eines sequenzabhängigen Protokolls Nukleinsäuren herzustellen, die Acyltransferasen oder acyltransferaseähnliche Enzyme kodieren.

34. Verfahren gemäß Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäurefragmente aus Pflanzen, insbesondere zweikeimblättrigen Pflanzen, isoliert werden.

1/5

FIG. 1

```

1:  GTTCTATTCA  TGGCCAAAAC  TAGAACTAGC  TCTCTCCGCA  ACAGGAGACA  ACTAAAGCCC
61:  GCTGTAGCTG  CTACTGCTGA  TGATGATAAA  GATGGGGTTT  TTATGGTATT  GCTATCGTGT
121:  TTTAAAAATT  TTGTTTGCTT  TGCCATAGTG  TTGATCACCG  CGGTGGCATG  GGGACTAATC
181:  ATGGTCTTGC  TCTTACCTTG  GCCTTATATG  AGGATTCGAC  TAGGAAATCT  ATACGCCCAT
241:  ATCATTGGTG  GATTAGTGAT  ATGGATTTAC  GGAATACCAA  TAAAGATCCA  AGGATCGAG
301:  CATACAAAGA  AGAGGGCCAT  TTATATAAGC  AATCATGCAT  CTCCTATCGA  TGCTTCTTTT
361:  GTTATGTGGT  TGGCTCCCAT  AGGCACAGTT  GGTGTGCAA  AGAAAGAGGT  TATATCGTAT
421:  CCGCTGCTTG  GACAACTATA  TACATTAGCC  CATCATATTC  GCATAGATCG  GTCAAJCCCC
481:  GCTGCGGCTA  TTCAGTCTAT  GAAAGAGGCA  GTTCGTGTAA  TAACCGAANA  GAATCCTCTT
541:  CTGATTATGT  TTCCAGAGGG  AACCAGGTCG  AGAGATGGGC  GTTTACTTCC  TTTCAJGAAG
601:  GGTTTTGTTT  ATCTAGCACT  TCAGTCACAT  CTCCCAATAG  TTCCGATGAT  CCTTAAGGT
661:  ACACATTTAG  CATGGAGGAA  AGGTACCTTC  CGGTCCGGC  CAGTACCCAT  CACTGCAAG
721:  TACCTTCCTC  CTATAAACAC  TGATGATTGG  ACTGTTGACA  AAATCGACGA  TTACGCAAAA
781:  ATGATACACG  ACGTCTATGT  CCGCAACCTA  CCTGCGTCTC  AAAAACCACT  TGGTAACACA
841:  AATCGCTCAA  ATGAGTCCC  TCTTTGCTCT  AAGGTTAGCA  GAATGGATAC  GTACTTTTGT
901:  CTTGCTGCAT  GAAAAGTTTA  ATCCTTCTCT  ATGATATTAG  ATTACAGCGT  AAGACTTTCA
961:  TGTAAATA  GTGTAACAGT  GCTTCTGGTT  TGTAACTTTT  ACAATAAAG  TATGCTTTTG
1021:  AAAAAAAAAA  AAAAAAAAAA

```

FIG. 2

```

1:  MAKTRTSSLR  NRRQLKPAVA  ATADDDKDG  VFMVLLSCEKI  FVCFIVLIT  AVAWGLIMVL
61:  LLPWPYMRIR  LGNLYGHIIG  GLVIWYIGIP  IKIQSEHTK  KRAIYISNHA  SPIDAFFVMW
121:  LAPIGTVGVA  KKEVIWYPLL  GQLYTLAHHI  RIDRSNPAAA  IQSMKEAVRV  ITEKNLSLIM
181:  FPEGTRSRDG  RLLPFKKGEV  HLALQSHLPI  VPMILTGTHL  AWRKGTFRVR  PVPITVKYLP
241:  PINTDDWTVD  KIDDYVKMIH  DVYVRNLPAS  QKPLGSTNRS  N

```

FIG. 3

```

CH 21      :  -----GTTCTATTCATGGCC
CH 149     :  CTAATACTCTCTACTGAATTTTAGGTCAAACAATCTCATAGCCGGTTCATTCATGGCC
               +++
               ***

CH 21      :  AAACTAGAACTAGCTCTCTCCGCAACAGGAGACAACTAAAGCCGGCTGTAGCTGCTACT
CH 149     :  AAACTAGAACTAGCTCTCTCCGCAACAGGAGACAACTAAAGCCGGCTGTAGCTGCTACT

CH 21      :  GCTGATGATGATAAAGATGGGGTTTTTATGGTATTGCTATCGTGTTTTTAAATTTTGT
CH 149     :  GCTGATGATGATAAAGATGGGGTTTTTATGGTATTGCTATCGTGTTTTTAAATTTTGT

CH 21      :  TGCTTTGCCATAGTGTGATCACCGGGGTGGCATGGGGACTAATCATGGTCTTGCTCTTA
CH 149     :  TGCTTTGCCATAGTGTGATCACCGGGGTGGCATGGGGACTAATCATGGTCTTGCTCTTA

CH 21      :  CCTTGGCCTTATATGAGGATTCGACTAGGAAATCTATACGGCCATATCATTTGGTGATTA
CH 149     :  CCTTGGCCTTATATGAGGATTCGACTAGGAAATCTATACGGCCATATCATTTGGTGATTA

```



FIG. 4

3/5

```

Mai      : -----V
Hefe     : MSVIGRFLYYLRSVLVVLAALAGCGFYGVIASILCTLIQKQHLAQWITARCFYHVMQMLG
E.coli   : MLYIFRLIITVIYSILVC-----VFGSIYCLFSPRNPKHVATFGHMFGR LAPFLGFL
Salmonella : MLYIFRLIVTVIYSILVC-----VFGSIYCLFSPRNPKHVATFGHMFGR LAPFLGFL

Mai      : KVQLHA--DEETYRSMGKEHALIISNHRSDIDWLGWILAQRSGCLGSTLAVHKSSSKFL
Hefe     : LDVKVVGEENLAKK-----PYIMIANHQSTLDIFMLGRIFPPG-----CTVTAKKSLKYV
E.coli   : KVECRKPTDAESYG-----NAIYIANHQNNYDMVTASNIVQPP-----TVTVGKKSLLWI
Salmonella : KVECRKPADAENYG-----NAIYIANHQNNYDMVTASNIVQPP-----TVTVGKKSLLWI
          .      * * *      .      *      .      *      .      *      .      *      .      *      .

Mai      : PVIGWSHWFAEYLFLEERS-WAKDEKTLKWGLQRLKDFPRPFWLALFVEGTRFTPAKLLA-
Hefe     : PFLGWFMALSGTYFLDRSKRQEAIDTLNKGLENVKGNKRALW--VFPEGTRSYTSELTML
E.coli   : PFFGQLYWLTGNLLIDRNNRTKAHGTIAEVVNHFKKRRISIW--MFPEGTRSRGRGL--L
Salmonella : PFFGQLYWLTGNLLIDRNNRAKAHSTIAAVVNHFKKRRISIW--MFPEGTRSRGRGL--L
          * *      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .

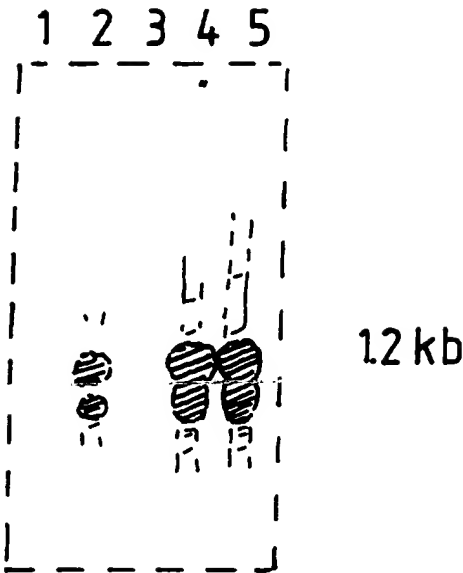
Mai      : -----AQEYAASQGLPA-----PRNVLIPTKGFVS
Hefe     : PFKKGAFHLAQQGIPIVFWVSNTSTLVSPKYGVFNRCMIVRILKPISTENLTQDKIG
E.coli   : PFKTGAFHAAIAAGVPIIPVCVSTTSNKINLNR--LHNGLVIVEMLPPIDVSYGKDQVR
Salmonella : PFKTGAFHAAIAAGVPIIPVCVSTTSNKVNLNR--LNNGLVIVEMLPPIVDVSEYKQDQVR
          *      *      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .

Mai      : AVS-----
Hefe     : EFAEKVRDOMVDTLKEIGYSPAINDTLPPQAI EYAALQHDKKVNKKIKNEPVPSVSISN
E.coli   : ELAAHCRSIMEQKIAELDKVAEREAGKV-----
Salmonella : ELAAHCRALMEQKIAELDKVAEREATGKV-----

Mai      : -----
Hefe     : DVNTHNEGSSVKQGH
E.coli   : -----
Salmonella : -----

```

FIG. 5



TAB. 1

	ECO	SAL	SAC	ZEA
ECO		93,9	31,4	28,5
SAL			33,1	30,0
SAC				30,9

TAB. 2

5/5

	ECO	SAL	SAC	ZEA	LIM
ECO		93,9	31,4	28,5	27,3
SAL			33,1	30,0	26,9
SAC				30,9	30,9
ZEA					28,4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 95/01278

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/54 C12N15/82 C12N5/10 A01H5/00 C11B1/00  
C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01H C11B C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
O,X	PLANT LIPID METAB., [PAP. INT. MEET. PLANT LIPIDS], 11TH (1995), MEETING DATE 1994, 531-3. EDITOR(S): KADER, JEAN-CLAUDE; MAZLIAK, PAUL. PUBLISHER: KLUWER, DORDRECHT, NETH., HANKE, CHRISTIANE, ET AL. 'cDNA clones from Limnanthes douglasii encoding an erucoyl-CoA specific 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase'	1-11, 29
Y	see the whole document	12-28, 30-34
Y	WO,A,94 13814 (NICKERSON BIOCEM LTD ; SLABAS ANTONI RYSZARD (GB); BROWN ADRIAN PAU) 23 June 1994 see the whole document	12-28, 30-34
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 January 1996

Date of mailing of the international search report

27.02.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inter national Application No  
 PCT/DE 95/01278

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FETT WISS. TECHNOL. (1991), 93(8), 288-90, WOLTER, F. P., ET AL. 'Biochemical and molecular biological approaches for changing the fatty acid composition of rape seed oil' see the whole document ---	12-28, 30-34
X	JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY, vol. 69, no. 4, 1992 pages 355-358, TAYLOR, D.C., ET AL. 'Formation of trierucoylglycerol (Trierucin) from 1,2-dierucoylglycerol by a homogenate of microspore-derived embryos of Brassica napus L.' see the whole document ---	26,27,32
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 94, Philadelphia, PA, US; abstract no. 136764, see abstract & PLANTA (HEIDELB) 188 (2). 1992. 215-224., LOEHDEN I., ET AL. 'TRIACYLGLYCEROL BIOSYNTHESIS IN DEVELOPING SEEDS OF TROPAEOLUM-MAJUS L. AND LIMNANTHES-DOUGLASII R. BR.' ---	29
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 119, no. 19, 8 November 1993 Columbus, Ohio, US; abstract no. 199618, TAYLOR, D.C., ET AL. 'Biosynthesis of triacyl glycerols in Brassica napus L. cv Reston; Target: trierucin' see abstract & SEED OILS FUTURE. EDS: MACKENZIE, S.L., ET AL., AOCS, CHAMPAIGN, ILL., 1992 pages 77-102, ---	29
X	PLANT PHYSIOL. (1990), 94(3), 1199-206, CAO, YI ZHI., ET AL. 'Lysophosphatidate acyltransferase in the microsomes from maturing seeds of meadowfoam( Limnanthes alba)' see the whole document ---	29

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 95/01278

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY 232 (3). 1995. 806-810., HANKE C., ET AL. 'A plant acyltransferase involved in triacylglycerol biosynthesis complements an Escherichia coli sn-1- acylglycerol-3-phosphate acyltransferase mutant.' see the whole document ---	1-11,29
A	JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY , vol. 71, no. 2, February 1994 pages 163-167, TAYLOR, D.C., ET AL. 'Stereospecific analysis of seed triacylglycerols from high -erucic acid Brassicaceae: Detection of erucic acid at the sn-2 position in Brassic oleracea L. genotypes' see the whole document ---	1-32
A	PLANTA, vol. 185, 1991 pages 124-131, HARES, W., ET AL. 'substrate specificities of the membrane-bound and partially purified microsomal acyl-CoA:1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase from etolated shoots of Pisum sativum (L.)' see the whole document ---	29
A	MOLELULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 232, 1992 pages 295-303, COLEMAN, J. 'Characterization of the Escherichia coli gene for 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (plsC)' see the whole document ---	1-11
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, 1993 pages 22156-22163, NAGIEC, N.M., ET AL. 'A suppressor gene that enables Saccharomyces cerevisiae to grow without making sphingolipids encodes a protein that resembles an Escherichia coli fatty acyltransferase' see the whole document ---	1-11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 95/01278

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	SCIENCE, vol. 268, 5 May 1995 pages 681-686, TÖPFER, R., ET AL. 'Modification of plant lipid synthesis' see page 685, left column ---	1-34
E	WO,A,95 27791 (CALGENE INC ;DAVIES HUW MAELOR (US); HAWKINS DEBORAH (US); NELSEN) 19 October 1995 see page 58 - page 78 -----	1-28, 30-32

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 95/01278

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9413814	23-06-94	AU-B- 5656794 CA-A- 2151147 EP-A- 0673424 PL-A- 309327	04-07-94 23-06-94 27-09-95 02-10-95
-----			
WO-A-9527791	19-10-95	NONE	
-----			



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 95/01278

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/54 C12N15/82 C12N5/10 A01H5/00 C11B1/00  
C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A01H C11B C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
O,X	PLANT LIPID METAB., [PAP. INT. MEET. PLANT LIPIDS], 11TH (1995), MEETING DATE 1994, 531-3. EDITOR(S): KADER, JEAN-CLAUDE; MAZLIAK, PAUL. PUBLISHER: KLUWER, DORDRECHT, NETH., HANKE, CHRISTIANE, ET AL. 'cDNA clones from <i>Limnanthes douglasii</i> encoding an erucoyl-CoA specific 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase'	1-11, 29
Y	siehe das ganze Dokument	12-28, 30-34
Y	WO, A, 94 13814 (NICKERSON BIOCEM LTD; SLABAS ANTONI RYSZARD (GB); BROWN ADRIAN PAU) 23. Juni 1994 siehe das ganze Dokument	12-28, 30-34
	--- -/-- ---	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31. Januar 1996

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

27.02.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Befullmächtigter Bediensteter

Maddox, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	FETT WISS. TECHNOL. (1991), 93(8), 288-90, WOLTER, F. P., ET AL. 'Biochemical and molecular biological approaches for changing the fatty acid composition of rape seed oil' siehe das ganze Dokument ---	12-28, 30-34
X	JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY, Bd. 69, Nr. 4, 1992 Seiten 355-358, TAYLOR, D.C., ET AL. 'Formation of trierucoylglycerol (Trierucin) from 1,2-dierucoylglycerol by a homogenate of microspore-derived embryos of Brassica napus L.' siehe das ganze Dokument ---	26,27,32
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 94, Philadelphia, PA, US; abstract no. 136764, siehe Zusammenfassung & PLANTA (HEIDELB) 188 (2). 1992. 215-224., LOENDEN I., ET AL. 'TRIACYLGLYCEROL BIOSYNTHESIS IN DEVELOPING SEEDS OF TROPAEOLUM-MAJUS L. AND LIMNANTHES-DOUGLASII R. BR.' ---	29
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 119, no. 19, 8.November 1993 Columbus, Ohio, US; abstract no. 199618, TAYLOR, D.C., ET AL. 'Biosynthesis of triacyl glycerols in Brassica napus L. cv Reston; Target: trierucin' siehe Zusammenfassung & SEED OILS FUTURE. EDS: MACKENZIE, S.L., ET AL., AOCS, CHAMPAIGN, ILL., 1992 Seiten 77-102, ---	29
X	PLANT PHYSIOL. (1990), 94(3), 1199-206, CAO, YI ZHI., ET AL. 'Lysophosphatidate acyltransferase in the microsomes from maturing seeds of meadowfoam( Limnanthes alba)' siehe das ganze Dokument ---	29

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY 232 (3). 1995. 806-810., HANKE C., ET AL. 'A plant acyltransferase involved in triacylglycerol biosynthesis complements an Escherichia coli sn-1- acylglycerol-3-phosphate acyltransferase mutant.' siehe das ganze Dokument ---	1-11,29
A	JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY , Bd. 71, Nr. 2, Februar 1994 Seiten 163-167, TAYLOR, D.C., ET AL. 'Stereospecific analysis of seed triacylglycerols from high -erucic acid Brassicaceae: Detection of erucic acid at the sn-2 position in Brassic oleracea L. genotypes' siehe das ganze Dokument ---	1-32
A	PLANTA, Bd. 185, 1991 Seiten 124-131, HARES, W., ET AL. 'substrate specificities of the membrane-bound and partially purified microsomal acyl-CoA:1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase from etolated shoots of Pisum sativum (L.)' siehe das ganze Dokument ---	29
A	MOLEULAR AND GENERAL GENETICS, Bd. 232, 1992 Seiten 295-303, COLEMAN, J. 'Characterization of the Escherichia coli gene for 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (plsC)' siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 268, 1993 Seiten 22156-22163, NAGIEC, N.M., ET AL. 'A suppressor gene that enables Saccharomyces cerevisiae to grow without making sphingolipids encodes a protein that resembles an Escherichia coli fatty acyltransferase' siehe das ganze Dokument ---	1-11

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	SCIENCE, Bd. 268, 5.Mai 1995 Seiten 681-686, TÖPFER, R., ET AL. 'Modification of plant lipid synthesis' siehe Seite 685, linke Spalte ---	1-34
E	WO,A,95 27791 (CALGENE INC ;DAVIES HUW MAELOR (US); HAWKINS DEBORAH (US); NELSEN) 19.Oktober 1995 siehe Seite 58 - Seite 78 -----	1-28, 30-32

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 95/01278

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9413814	23-06-94	AU-B- 5656794	04-07-94
		CA-A- 2151147	23-06-94
		EP-A- 0673424	27-09-95
		PL-A- 309327	02-10-95
-----			
WO-A-9527791	19-10-95	KEINE	
-----			